



دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده پزشکی

گروه فیزیک و مهندسی پزشکی

پایان نامه دکتری تخصصی (Ph.D) فیزیک پزشکی

عنوان پایان نامه:

مطالعه اثر حفاظت پرتوئی اسید گلیسرین بر تغییرات کوتاه مدت و دراز مدت بافت ریه موش

بدنبال پرتوگیری از طریق بررسی بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$

دانشجو:

سهیلا رفاهی

استاد راهنما:

دکتر عباس تکاور

اساتید مشاور:

دکتر باقر مینائی، دکتر سمیده خوئی، دکتر غلامحسین حدادی

سال: ۱۳۹۳

شماره: ۳۶

حق استفاده از مفاد این پایان نامه برای دانشگاه علوم پزشکی تهران محفوظ است.

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم بہ:

پدر بزرگوارم

بہ پاس رنج سالیان، تکیہ گاہ پر غرور ہستی ام، او کہ در باغ زندگی غنچہ حیاتش را بہ
ثمر رساند مرد سخاوت و مہربانی، مظهر استواری و ارادہ، کہ سپیدی مولیش یاد آور
اسوہ تلاش است۔

و تقدیم بہ زیبا ترین واژہ حیات

مادر عزیزم

او کہ سہل از خود گذشتگی است

بہ پاس دستان پر عطوفتش کہ تدیس عشق و سخاوت است

و قلب مهربانش که مالامال از مهر و محبت است

و شانه بلایش که امن ترین تکیه گاهم هستند.

تقدیم به خواهران و برادرانم

که همواره مایه شادی و دلگرمی ام بودند و هستند و صمیمیت و یکرنگی شان راتا

انتهای آبی آسمان دوست دارم.

تقدیم به استادگرمی ام

آقای دکتر عباس تگاور

و سپاس فراوان از راهنمائی های ارزشمندشان

با تشکر فراوان از زحمات اساتید ارجمندم

آقای دکتر باقرینائی

خانم دکتر سمیده خویی

آقای دکتر غلامحسن حدادی

تقدیم به تمام استادان گرانقدرم در گروه فیزیک پزشکی دانشکده پزشکی که هرچه
آموختم مدیون آنها هستم.

تقدیم به دکتر فاضل شمس، دکتر اعظم بختیاریان، دکتر ساسان صابرو دکتر پیروز
صاحبان به جهت همکاری صمیمانه شان

باتشکر از همکاری صمیمانه آقای احمد شمس، آقای رضا ابراهیم زاده، آقای محمد

رضازیرک، خانم کیتی غامی و خانم سودابه هوشیاری

مطالعه اثر حفاظت پرتوئی اسید گلیسرزیک بر تغییرات کوتاه مدت و دراز مدت بافت ریه موش

بدنبال پرتوگیری از طریق بررسی بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$

چکیده:

مقدمه: استفاده از رادیوتراپی برای درمان سرطان به ناچار باعث تابش گیری بافتهای نرمال می شود. هدف از این تحقیق مطالعه اثر حفاظت پرتوئی اسید گلیسرزیک بر تغییرات کوتاه مدت و دراز مدت بافت ریه موش بدنبال پرتوگیری از طریق بررسی بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ است.

مواد و روش ها: ۱۵۰ موش نر Wistar به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول زیر تابش ۱۶ گری پرتو به کل قفسه سینه قرار گرفتند (XRT). گروه دوم زیر تابش پرتو همراه با دریافت ۴ mg/kg اسید گلیسرزیک بصورت تزریق داخل صفاقی یک ساعت قبل از درمان قرار گرفتند (GLA/XRT). گروه سوم فقط ۴ mg/kg اسید گلیسرزیک دریافت نمودند (GLA). گروه چهارم هیچ گونه پرتو و یا اسید گلیسرزیک دریافت نکردند (NT). موشها در زمانهای ۱ و ۶ ساعت، ۱ و ۳ روز، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ هفته بعد از پرتو تابی قربانی شدند. بررسی بیان نسبی ژن $TNF-\alpha$ به روش real time RT-PCR (مقایسه با گروه NT) انجام شد. بررسی بیان پروتئین $TNF-\alpha$ به روش ELISA انجام شد. یافته های هیستوپاتولوژیکی آسیبهای زودرس و دیررس در چهار گروه مقایسه شدند.

نتایج: یافته های هیستوپاتولوژیکی آسیبهای زودرس در گروه XRT اختلاف آماری معنی داری را با سایر گروهها نشان داد. یافته های آسیبهای دیررس هیچ گونه اختلاف آماری معنی داری را در بین گروهها نشان نداد. بدنبال تابش تک دز ۱۶ گری به قفسه سینه بیان ژن $TNF-\alpha$ در گروه XRT بطور واضح بیشتر از سایر گروهها بود (از نظر آماری فقط در ۱ ساعت بعد از تابش معنی دار بود). بیان پروتئین $TNF-\alpha$ در گروه XRT بطور قابل توجهی بیشتر از سایر گروهها بود (از نظر آماری در ۶ ساعت و ۱۶ هفته بعد از پرتو تابی معنی دار بود).

بحث و نتیجه گیری: GLA با جاروب رادیکالهای آزاد اثر تنظیم منفی بر میزان تولید ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ در بافت ریه در پاسخ به تابش پرتو دارد و باعث کاهش آسیبهای زود رس و دیررس بافت ریه می شود.

کلمات کلیدی: اسید گلیسرزیک، پرتودهی، بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ ، آسیب ریه

فهرست

فصل اول مقدمه	۱
۱-۱. بیان مساله	۲
۱-۲. اهداف و فرضیات	۲-۱
۱-۲-۱. اهداف فرعی	۷
۱-۲-۳. فرضیات	۷
فصل دوم بررسی متون	۹
۱-۲. سابقه طرح و بررسی متون	۱۰
۲-۲. تقسیم بندی رادیوپروتکتورها	۱۴
۲-۳. مکانیسم عمل رادیو پروتکتورها	۱۵
فصل سوم مواد و روشها	۳۰
۱-۳. مطالعات مربوط به تعیین دز بهینه تابش	۳۱
۲-۳. مطالعات مربوط به بررسی اثر اسید گلیسریدیک	۳۴
۳-۳. مطالعات هیستوپاتولوژیکی بافت	۳۶
۴-۳. مطالعات بیان ژن $TNF-\alpha$	۴۲
۱-۴-۳. چگونگی خارج کردن RNA از نمونه های بافتی	۴۳
۲-۴-۳. طریقه ساختن CDNA	۴۴
۳-۴-۳. REAL TIME RT PCR	۴۶
۴-۴-۳. طراحی پرایمر	۴۸
۵-۴-۳. آنالیز MELING POINT برای تعیین اختصاصی بودن محصولات	۵۰
۵-۳. مطالعات بیان پروتئین $TNF-\alpha$	۵۰
۱-۵-۳. طریقه هموژنیزه کردن بافت ریه برای بررسی بیان پروتئین $TNF-\alpha$	۵۱
۲-۵-۳. اندازه گیری میزان پروتئین تام به روش برادفورد	۵۲
۳-۵-۳. آزمون اندازه گیری میزان پروتئین $TNF-\alpha$ در بافت ریه به روش الایزا	۵۳
۶-۳. نوع مطالعه	۵۳
۷-۳. روش محاسبه حجم نمونه	۵۳

۵۴.....	۸-۳. مشخصات ابزار و نحوه جمع آوری اطلاعات.....
۵۴.....	۹-۳. روشهای آماری وآنالیز داده ها.....
۵۵.....	۱۰-۳. ملاحظات اخلاقی.....
۵۵.....	۱۱-۳. محدودیتهای اجرایی طرح وروش کاهش آنها.....
۵۵.....	۱۲-۳. متغیرها.....
۵۷.....	فصل چهارم نتایج.....
۵۸.....	۱-۴. نتایج مربوط به رسم منحنی دز-پاسخ به دز.....
۵۹.....	۲-۴. نتایج مربوط به مطالعات هیستوپاتولوژیکی زودرس.....
۶۱.....	۳-۴. نتایج مربوط به مطالعات هیستوپاتولوژیکی دیررس.....
۶۴.....	۴-۴. نتایج مربوط به مطالعات بیان نسبی ژن $TNF-\alpha$
۶۷.....	۱-۴-۴. نتایج مطالعات آماری بیان نسبی ژن $TNF-\alpha$
۶۸.....	۵-۴. نتایج مربوط به مطالعات بیان پروتئین $TNF-\alpha$
۷۱.....	۱-۵-۴. نتایج مطالعات آماری بیان پروتئین $TNF-\alpha$
۷۲.....	۶-۴. مقایسه میزان بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ بعد ازپرتوگیری تک دز۱۶ گری اشعه گاما در گروه XRT.....
۷۴.....	۷-۴. مقایسه میزان بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ بعد ازپرتوگیری تک دز۱۶ گری اشعه گاما در گروه GLA/XRT.....
۷۴.....
۷۵.....	۸-۴. نتایج مربوط به رسم منحنی بقا و محاسبه DRF.....
۷۸.....	فصل پنجم بحث و نتیجه گیری.....
۷۹.....	۱-۵. بحث.....
۹۴.....	۲-۵. نتیجه گیری.....
۹۶.....	۳-۵. پیشنهادات.....
۹۷.....	منابع:.....

فهرست جدول ها

جدول ۱-۲. تغییرات هیستوپاتولوژیکی در ریه بعد از تابش پرتو [۷۸].....	۲۴
جدول ۱-۳. مدت زمان تابش در دزهای مختلف پرتو دهی در $SSD=۸۰$ و اندازه میدان ۳۵×۵	۳۲
جدول ۲-۳. توالی پرایمرها و اندازه نوکلئوتیدها (base pair) برای ژنهای بکار رفته.....	۴۹
جدول ۳-۳. مواد موجود در بافر لیز کننده [۸۸].....	۵۴
جدول ۴-۳. متغیرها.....	۵۹
جدول ۱-۴. میانگین نمره پنومونی در گروههای مختلف.....	۶۰
جدول ۲-۴. میانگین نمره فیبروز در گروههای مختلف.....	۶۲
جدول ۳-۴. مقادیر pvalue در بررسی بیان نسبی ژن $TNF-\alpha$ در نقاط زمانی مختلف در بین گروهها.....	۶۸
جدول ۴-۴. مقادیر pvalue در بررسی بیان پروتئین $TNF-\alpha$ در نقاط زمانی مختلف در بین گروهها.....	۷۲
جدول ۵-۴. مقایسه مرگ و میر و بقا موشهاردو گروه XRT و GLA/XRT بعد از پرتوگیری تک دز ۱۶ گری اشعه گاما.....	۷۷
جدول ۱-۵. مطالعات انجام گرفته با اسید گلیسرزیک جهت بررسی اثر رادیوپروتکتوری آن.....	۸۵

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۲. گیاه شیرین بیان..... ۱۰
- شکل ۲-۲. ساختمان مولکولی اسید گلیسرزیک [۱۴]..... ۱۲
- شکل ۳-۲. مکانیسمهای رادیوپروتکتوری [۴۰]..... ۱۴
- شکل ۴-۲. نحوه عمل رادیوپروتکتورهای گیاهی..... ۱۶
- شکل ۵-۲. واکنش چند سلولی سایتوکینها با تغییرات بافت همبند..... ۲۱
- شکل ۶-۲. مهاجرت لکوسیتها به محل عفونت در اثر تولید سایتوکین $TNF-\alpha$ [۸۴]..... ۲۶
- شکل ۷-۲. ساختمان $TNF-\alpha$ با سه زیر واحد یکسان (همو تراimer) همراه با رسپتورها [۸۴]..... ۲۷
- شکل ۸-۲. اثرات وابسته به دز سایتوکین $TNF-\alpha$ [۸۴]..... ۲۸
- شکل ۱-۳. نحوه تزریق داخل صفاقی و نحوه پرتو تابی موشها..... ۳۲
- شکل ۲-۳. منحنی تکثیر محصول در سیکلهای مختلف PCR..... ۵۰
- شکل ۳-۳. منحنی تکثیر محصول در سیکلهای مختلف PCR در برنامه Linreg..... ۵۱
- شکل ۴-۳. منحنی ذوب برای بررسی غیر اختصاصی بودن محصول..... ۵۲
- شکل ۱-۴. منحنی دز- پاسخ به دز، تغییرات شدت آسیبهای زودرس ریه برحسب دزهای مختلف اشعه گاما... ۵۹
- شکل ۲-۴. مقطع هیستوپاتولوژیکی بافت ریه در کمتر از ۶ هفته بعد از پرتوگیری در گروههای مختلف جهت بررسی آسیبهای زودرس (پنومونی) ($H\&E, \times 400$)..... ۶۱
- شکل ۳-۴. مقطع هیستوپاتولوژیکی بافت ریه در بیشتر از ۶ هفته بعد از پرتوگیری در گروههای مختلف جهت بررسی آسیبهای دیررس (فیروز) ($H\&E, \times 400$)..... ۶۳
- شکل ۴-۴. منحنی تکثیر محصول در سیکلهای مختلف PCR..... ۶۴
- شکل ۵-۴. منحنی تکثیر محصول در سیکلهای مختلف PCR در برنامه Linreg..... ۶۵

- شکل ۶-۴. منحنی ذوب برای بررسی غیر اختصاصی بودن محصول..... ۶۶
- شکل ۷-۴. میزان بیان نسبی ژن $TNF-\alpha$ در زمانهای مختلف بعد از پرتوگیری تک دز ۱۶ گری اشعه گاما ۶۷
- شکل ۸-۳. منحنی استاندارد مربوط به تعیین میزان پروتئین Bradford assay..... ۶۸
- شکل ۹-۳. منحنی استاندارد مربوط به پروتئین $TNF-\alpha$ ۶۹
- شکل ۱۰-۴. میزان بیان پروتئین $TNF-\alpha$ در زمانهای مختلف بعد از پرتوگیری تک دز ۱۶ گری اشعه گاما ۷۱
- شکل ۱۱-۴. میزان بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ بعد از پرتوگیری تک دز ۱۶ گری اشعه گاما در گروه XRT ۷۳
- شکل ۱۲-۴. میزان بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ بعد از پرتوگیری تک دز ۱۶ گری اشعه گاما در گروه GLA/XRT ۷۴
- شکل ۱۳-۴. تغییرات در رخداد مرگ و میر در گروه (XRT) (خط نقطه چین) و گروه (GLA/XRT) (خط پیوسته) بعد از تابش گیری ریه با تک دز ۱۶ گری اشعه گاما ۷۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱. بیان مساله

اهمیت رادیکالهای آزاد و نمونه های فعال وابسته به آن در ایجاد آسیب های حاصل از تابش پرتو و در حفاظت پرتوی: بسیاری از تغییرات حاصله از تابش پرتو بطور مستقیم بوده و با تولید رادیکالهای آزاد و نمونه های فعال مشتق شده از اکسیژن همراه است. رادیکالهای آزاد به علت جفت الکترون غیر پیوندی بسیار فعال بوده و نیمه عمر کوتاه دارند و تغییراتی در مولکولهای بیولوژیکی مثل لیپید ها، DNA و پروتئین ها ایجاد می کنند. در محیط بیولوژیکی آب رادیولیز شده و نمونه های فعال اکسیژن (ROS: reactive oxygen species) ایجاد می شود و تغییرات نامطلوب در مولکولهای بیولوژیکی ایجاد می کند. آنتی اکسیدانها موادی هستند که رادیکالهای آزاد را خنثی کرده و آنها را غیر فعال می کنند. این مواد لازم است در محیط های بیولوژیکی با غلظت کافی و در زمان تابش پرتو وجود داشته باشند. تابش پرتو باعث ایجاد تهوع و استفراغ و عفونت میشود گیاهان و اجزای ترکیبی آنها با خاصیت ضد التهابی می توانند بعنوان رادیوپروتکتور عمل کنند یکی از ترکیبات ضد التهابی گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhizia glabra*) می باشد [۱-۲].

داروهای گیاهی بطور اساسی در کشورهای در حال توسعه برای مراقبت بهداشتی اولیه به خاطر پذیرش فرهنگی، سازگاری با بدن انسان و اثرات سوء کمتر یک تکیه گاه اصلی برای جمعیت دنیا است. در چند سال گذشته افزایش زیادی در استفاده از آنها در دنیای پیشرفته مشاهده شده است. سازمان بهداشت جهانی اخیراً "طب سنتی (شامل گیاهان دارویی) را بعنوان شیوه درمانی معرفی کرده اغلب برای صدها سال قبل از تکامل و توسعه طب نوین موجود بوده و هنوز هم امروزه بکار میرود [۳].

استفاده روز افزون از پرتوهای یونساز در زمینه های مختلف پزشکی (درمانی و تشخیصی) از یک سو و افزایش احتمال وقوع تابشهای شغلی و تابش عموم مردم در مواقع سوانح هسته ای از طرف دیگر، با توجه به اثرات زودرس و دیررس آن لزوم حفاظت پرتوی را طلب می کند [۴].

رادیوتراپی یکی از چند درمان موثر بیماری سرطان می باشد. ۸۰٪ از بیماران سرطانی برای مقاصد درمانی و تسکینی نیاز به رادیوتراپی دارند. برای رسیدن به نتایج بهینه، باید تعادلی بین دز کلی رادیوتراپی و آستانه محدود دز بافتهای سالم اطراف برقرار شود تا تومور بهتر کنترل شده و بافتهای

سالم از آسیبهای پرتودهی حفاظت شوند [۵-۶]. در این بیماران آسیب بافت ریوی بطور نسبتاً شایع در ۱۰-۵ موارد مشاهده شده است. اثر مخرب غالب تابشهای یونساز در نمونه های بیولوژیک، ایجاد نمونه های فعال اکسیژن (ROS) به روش غیر مستقیم (تقریباً ۷۰٪) ناشی از برخورد اشعه با مولکول های آب می باشد که تولید رادیکالهای آزاد تاثیر گذار بر روی ساختارهای زیر سلولی به ویژه مولکول DNA می نماید. عقیده بر آن است که حدود ۷۰٪-۶۰٪ آسیب های وارده در اثر تابش یونیزان به بافت در نتیجه عمل رادیکال های آزاد هیدروکسیل (OH^0) می باشد [۷-۱۰].

با توجه به ارتباط نزدیک بین رادیکال های آزاد (بخصوص نمونه های فعال اکسیژن) و آپوپتوز، بیشتر درمان های ضد سرطان نظیر رادیوتراپی و همچنین تابش گیری در زیر پرتوهای یونساز به عموم مردم سبب ایجاد آسیب DNA و آپوپتوز در سلول های سالم می شوند [۱۱]. از آنجائی که آسیب سلولی ناشی از تابشهای یونساز بطور ابتدایی به اثرات زیانبار رادیکالهای آزاد نسبت داده می شود، بکار گیری مولکولهایی با ویژگی های جاروب کنندگی مستقیم رادیکال های آزاد بخصوص بعنوان حفاظت کننده های پرتوی (رادیوپروتکتورها) مطلوب می باشند [۱۱-۱۲]. در سالهای اخیر توانایی اسیدگلیسریریک (GLA) در جاروب رادیکال های آزاد دلیل اساسی برای سنجش اثر حفاظت پرتوی آن بوده است. آسیبهای ریوی حاصل از پرتودهی بیشتر بصورت پنومونی و فیبروز می باشد. پنومونی التهابی حاد که متعاقب آن فیبروز ریوی مزمن ایجاد می شود در بیمارانی با گرفتاری قسمتی از ریه ها و رادیوتراپی قفسه سینه مشاهده می شود. ریه ها وقتی تمام قفسه سینه در معرض پرتوگیری است حداقل تحمل دز را دارند [۱۳].

فاززودرس پاسخ به پرتوگیری تمام قفسه سینه ۶-۲ هفته بعد از پرتوگیری بوده واز نظر هیستولوژیکی بعنوان پنومونی تشعشع با ادم و هیپر پلازی التهابی آلئولی همراه است. ارتباط بین پنومونی و گسترش فیبروز نامعین است. اطلاعات از مطالعات انسانی و حیوانی نشان میدهد که آسیبهای عروقی، مولکولهای چسبنده سلولی، استرس اکسیداتیو و سایتوکینهای پیش التهابی و پیش فیبروزی نقش حیاتی در گسترش پنومونی و فیبروز دارند [۱۴-۱۸].

پیشرفتهای تکنیکی و فیزیکی در رادیوتراپی مثل رادیوتراپی استریوتاکتیک و رادیوتراپی با یونهای سنگین و IMRT در کاهش اثرات مضر رادیاسیون مفیداست. رادیوتراپی همراه با داروهای رادیو

پروتکتیو بافت سالم یک استراتژی متناوب برای درمان بهینه می باشد [۱۹]. بنابراین نقش ترکیبات رادیوپروتکتور در رادیوتراپی بیماران دارای اهمیت است که بیشتر دربر گیرنده ترکیبات سولفیدریل و آنتی اکسیدانها می باشد. رادیو پروتکتورهای زیادی در ۵۰ سال گذشته معرفی شده اند بعضی از آنها به دلیل سمیت ذاتی و دوره فعال کوتاه استفاده محدودی دارند [۶].

ارزیابی تولید سایتوکینها ابزار مهمی در بررسی پاسخهای ایمنی در برابر محرکهائی نظیر عوامل بیماریزا می باشد. اینها توسط ماکروفاژها تولید می شود و نقش اولیه آنها در تنظیم سلولهای ایمنی است و میتواند آپوپتوز سلولی و التهاب ایجاد کند [۱۳، ۲۰].

آسیب ریوی حاد حاصله از رادیوتراپی تحت عنوان پنومونی و آسیب ریوی تاخیری بصورت فیروز نامیده میشود که در ارزیابی هیستوپاتولوژیکی پنومونی به صورت گشادی آلوئولها، تجمع منونوکلئرها و وجود آگزودا داخل آلوئولار و فیروز بصورت رسوب کلاژن در دیواره آلوئول ها مشاهده می شود [۱۸]. بیان ژن tumor necrosis factor alpha (TNF- α) با ادم ریوی حاصل از آسیب کوتاه مدت و دراز مدت تابش پرتو یونساز همراه است [۱۸، ۲۱].

آسیبهای ریوی حاصل از تابش پرتو اولین بار در سال ۱۸۹۸ بیان گردید. تفاوت بین دو نوع از آسیبهای ریوی حاصل از تابش پرتو، پنومونی و فیروز در سال ۱۹۲۵ توضیح داده شد. هر دو نوع آسیب ریوی امروزه در بیمارانی که قفسه سینه آنها زیر تابش پرتو یونساز قرار میگیرد مشاهده می شود. آسیب ریوی حاصل از تابش پرتو با پارانشیم نرمال ریه یک فاکتور محدود کننده دز در رادیوتراپی قفسه سینه می باشد که می تواند ساختمانهای دیگر داخل قفسه سینه علاوه بر ریه ها را گرفتار کند [۲۲-۲۳].

تابش پرتو های یوننده با آزادسازی موضعی انرژی باعث شکستن باندهای شیمیائی قوی شده و رادیکالهای آزاد فعال را ایجاد می کند، مولکولهای سلولی شامل پپتید ها، لیپید ها و DNA می توانند بطور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق واکنش پرتو یونیزان با مولکولهای آب تحت تاثیر قرار گیرند [۲۴-۲۵]. از آنجا که آسیب سلولی با رادیکالهای آزاد فعال ناپایدار حاصل از پرتو تابی ارتباط دارد [۲۶] اسکانوجرهای چنین رادیکالهای آزاد ضروری است تا حفاظت در برابر اثرات تخریبی پرتو تابی فعال گردد [۲۷].

سایتوکینهای زیادی تغییرات پاتولوژیکی ناشی از پرتو تابی را تنظیم میکنند. $TNF-\alpha$ یک سایتوکین پیش التهابی بدنبال رادیاسیون فورا" وارد عمل می شود. میزان آسیبهای ریوی حاصل از پرتو تابی بطور مستقیم متناسب با حجم ناحیه تابش شده، دز تشعشع و زمان تابش و تقطیع دز (تقسیم دز در چند جلسه) می باشد [۲۳].

تغییرات پاتولوژیکی بدنبال تابش به ریه در پنج فاز تقسیم می شود: (۱) فاز فوری که ساعتها و روزها بعد از پرتو تابی شروع می شود و معمولا" بدون علایم است. (۲) فاز نهفته که با تجمع تراوشات غلیظ همراه است. (۳) فاز ترشحات حاد که به پنومونی حاصل از پرتو تابی معروف است. (۴) فاز میانی که کلاژنها توسط فیروبلاستها تولید میشود. (۵) فاز نهائی که شامل فیروز است که شش ماه بعد از رادیاسیون رخ می دهد که با افزایش فیروبلاستها و کلاژن در داخل فضای آلوئولار همراه است [۲۸].

پرتوگیری کل ریه ها به میزان ۹-۱۲ گری تغییرات مورفولوژیکی و عملکردی در عرض سه ماه بعد از پرتو تابی را ایجاد می کند از نظرمورفولوژیکی ادم دیواره عروق یک یافته بسیار واضحی است [۲۹].

در انسان LD_{50} برای تابش دهی کل ریه ها تقریبا" ۱۰ گری است در موش صحرایی و آزمایشگاهی ۱۱-۱۵ گری گزارش شده است [۳۰].

تولید سایتوکین ها در ریه بدنبال پرتو تابی در مطالعات زیادی طی ده سال گذشته گزارش شده است. تغییر در سطح mRNA در تعداد زیادی از سایتوکینهای التهابی از جمله $TNF-\alpha$ مستند شده است. بیان سایتوکینها درواقع نشان دهنده گسترش علائم پنومونی و فیروز حاصل از پرتو تابی می باشد [۳۰].

اتفاقات مولکولی زودتر از تغییرات هیستوپاتولوژیکی و کلینیکی نمایان می شود و یکی از فرایندهای فعال، ایجاد تغییر در سایتوکین های التهابی است [۱۵]. $TNF-\alpha$ سایتوکینی با فعالیت التهابی وسیع است که به پاسخ التهابی و ایمنی ریه در برابر چالشهای میکروبی شرکت می کند. نقش $TNF-\alpha$ در التهاب ریه کاملاً مشخص نیست به نظر میرسد با ماهیت چالش میکروبی تغییر کند. بر اساس مطالعات انجام گرفته فعالیت $TNF-\alpha$ با بلوک شدن آنتی بادیها مهار می شود و یک نقش

اساسی را در التهاب ریه بازی می کند [۲۰]. این سایتوکین یک میانجی مهمی در عفونت و آسیبهای همزمان ریه است [۳۱].

ریه ارگان پیچیده ای است و بیش از چهل نوع سلول دارد و مقاومت آنها نسبت به اشعه متفاوت است. از آنجا که ظرفیت تولید مجدد ریه کمتر است دزهای زیاده‌پرتو یونساز را نمی تواند تحمل کند لذا حساسیت پرتوی آن یک عامل محدود کننده دزپرتودر رادیوتراپی قفسه سینه می باشد [۳۲-۳۳].

آسیبهای ریوی حاصل از پرتو تابی در تمام سطوح مولکولی تا سطح ارگان قابل بررسی است. پاسخ ریه به پرتو یونساز از طریق فرایندهای بیوشیمیائی و کینتیک سلولی و هیستوپاتولوژیکی و مرگ قابل ارزیابی است [۳۲].

با توجه به رشد بی رویه سرطان در کشوری که سرطان ریه بعلت آلودگی هوا در شهرهای بزرگ ایران وعدم دسترسی به داروهای گران قیمت خارجی و جهت حصول نتیجه درمانی بهینه و اهمیت کاربرد داروهای طب سنتی و گیاهی به نظر میرسد گیاهان داروئی از نظر حفاظت پرتوی باید مورد بررسی قرار گیرد. از طرفی تاکنون مطالعه ای در مورد تاثیر اسید گلیسرئیک بر کاهش التهاب ریوی حاصل از پرتو تابی از طریق بررسی میزان بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ انجام نگرفته است به نظرمی رسد با توجه به خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی اسید گلیسرئیک این ماده میتواند بر بیان ژن $TNF-\alpha$ تاثیر گذاشته و به کاهش آسیبهای حاصل از پرتوهای یونیزان و جلوگیری از پنومونی و فیبروز ریه حاصل از پرتو تابی کمک نماید. با توجه به اینکه در خصوص اثر حفاظت پرتوی اسید گلیسرئیک بر روی بافت ریه تا کنون مطالعه ای صورت نگرفته است لذا در این پروژه تاثیر اسید گلیسرئیک به عنوان رادیوپروتکتور برای ریه موش آزمایشگاهی از نظر آسیبهای کوتاه و دراز مدت پرتو تابی از طریق بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$ بررسی می شود. هدف کاربردی این طرح امکان استفاده از اسید گلیسرئیک جهت حفاظت بیمار در رادیوتراپی بیماران بویژه در کانسر قفسه سینه می باشد. هدف اصلی این طرح بررسی امکان استفاده از اسید گلیسرئیک جهت کاهش عوارض ناشی از تابش پرتوهای یونیزان به ریه به عنوان رادیوپروتکتور می باشد.

۲-۱. اهداف و فرضیات

۱-۲-۱. اهداف اصلی

مطالعه اثر حفاظت پرتوئی اسید گلیسرزیک بر تغییرات کوتاه مدت و دراز مدت بافت ریه موش
بدنبال پرتوگیری از طریق بررسی بیان ژن و پروتئین $TNF-\alpha$

۲-۲-۱. اهداف فرعی

بررسی تغییرات منجر به پنومونی حاصل از پرتو تابی پس از تجویز اسید گلیسرزیک و پرتوگیری
بافت ریه

بررسی تغییرات منجر به فیروز حاصل از پرتو تابی پس از تجویز اسید گلیسرزیک و پرتوگیری
بافت ریه

بررسی تغییرات بیان ژن $TNF-\alpha$ پس از پرتوگیری بافت ریه

بررسی تغییرات بیان ژن $TNF-\alpha$ پس از تجویز اسید گلیسرزیک و پرتوگیری بافت ریه

بررسی تغییرات بیان پروتئین $TNF-\alpha$ پس از پرتوگیری بافت ریه

بررسی تغییرات بیان پروتئین $TNF-\alpha$ پس از تجویز اسید گلیسرزیک و پرتوگیری بافت ریه

۳-۲-۱. فرضیات

بین اسید گلیسرزیک و تغییرات منجر به پنومونی حاصل از پرتو تابی ارتباط وجود دارد.

بین اسید گلیسرزیک و تغییرات منجر به فیروز حاصل از پرتو تابی ارتباط وجود دارد.

بین اسید گلیسرزیک و بیان ژن $TNF-\alpha$ ارتباط وجود دارد.

بین اسید گلیسریدیک و بیان پروتئین $\text{TNF-}\alpha$ ارتباط وجود دارد.
اسید گلیسریدیک می تواند عوارض حاصل از پرتوتابی در بافت ریه را کاهش دهد.

فصل دوم

بررسی متون



شکل ۱-۲. گیاه شیرین بیان

۱-۲. سابقه طرح و بررسی متون

گیاه شیرین بیان (Licorice) با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* از رستنیهای علفی خودرو بوده که در نواحی معتدل آسیا و شمال آفریقا و جنوب اروپا فراوان می‌روید و یکی از گیاهان بومی ایران در نواحی البرز شمالی- غربی و جنوبی است (شکل ۱-۲). برگهای آن مرکب است و از ۴ تا ۷ زوج برگ به اضافه یک برگچه انتهایی تشکیل یافته است که به سبب ترشح شیر، چسبنده‌اند [۳۴].

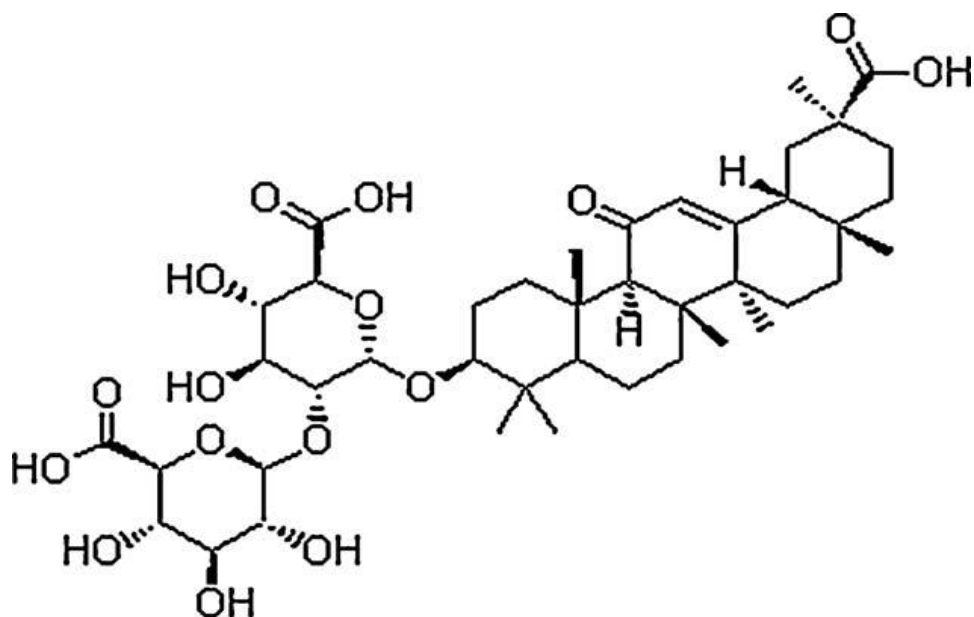
قسمت مورد استفاده شیرین بیان ساقه‌های زیرزمینی و ریشه‌های گیاه است که دارای ترکیبات مختلفی است. مهم‌ترین ماده اصلی که موجب شیرینی شیرین بیان است، ترکیب موجود در ریشه‌های گیاه به نام اسید گلیسرزیک (Glycyrrhizic acid) با فرمول مولکولی $(C_{16}H_{32}O_{16})$ و وزن مولکولی ۸۲۳g/mol است [۳۵] که پنجاه برابر از شکر شیرین‌تر است و مقدار آن با توجه به شرایط محیطی و گونه گیاه بین ۵ تا ۲۰ درصد است. مقدار اسید گلیسرزیک با افزایش سن گیاه افزایش می‌یابد. بعنوان یک افزودنی شیرین کننده در صنایع غذایی کاربرد دارد. پودر ریشه شیرین بیان (ریشه خشک ساییده گیاه) خلط‌آوری مؤثر است و از زمانهای باستان به این منظور مورد استفاده بوده است. در طب سنتی از این گیاه برای درمان اسپاسم عضلات و تورم، برونشیت، روماتیسم و ورم مفاصل استفاده می‌شود. امروزه نیز عصاره شیرین بیان یکی از اجزاء ترکیبی شربت سرفه به شمار می‌رود. این ماده به شکل طبیعی، در درمان زخمهای دهان و دستگاه گوارشی مفید است. شیرین بیان همچنین مدر (ادرارآور) و ملین است و می‌توان از آن به عنوان عامل ضدویروس موضعی برای زخم و التهاب

زونا، چشم، دهان و دستگاه تناسلی به کار برد. مهم‌ترین خاصیت شیرین بیان، تاثیر بر دستگاه گوارش و درمان گاستریت مزمن است. این گیاه درمان‌کننده ورم و زخم معده و اثنی‌عشر است و بر روی سرطان معده تاثیر مطلوب دارد [۳۶]. همچنین برای درمان سوءهاضمه و از بین بردن نفخ شکم مفید است. حدود ۲۴-۲ درصد از وزن خشک ریشه گیاه Licorice را اسید گلیسرئیک تشکیل می‌دهد. در بسیاری از کشورها به عنوان یک عامل درمانی بزرگی برای درمان هپاتیت ویروسی مزمن و درمانیت آلرژیک استفاده می‌شود. این ماده همچنین فعالیت ضد التهابی، ضد زخم، ضد هپاتوتوکسیک، ضد ویروسی دارد [۲، ۳۷].

اسید گلیسرئیک دارای خصوصیات رادیوپروتکتیو بوده و باعث بهبود اجزای ایمنی سلولی متعاقب پرتو دهی موشها می‌شود. مصرف بی رویه شیرین بیان یا سایر فرآورده‌های آن به سبب تحریک غدد فوق کلیوی و ترشح بیش از اندازه هورمون آلدسترون ممنوع اعلام گردیده است. این حالت سبب عوارضی چون اختلال در فعالیت‌های متابولسمی و بالا رفتن فشار خون می‌گردد. در صورت مصرف بیش از ۲۰ گرم در روز، بروز عوارض نامطلوب بعید نیست. استفاده زیاد از شیرین بیان برای طحال نیز مضر است.

آزمایشگاه تحقیقاتی دارو و غذا خاصیت غیر تراتوژنی اسید گلیسرئیک اسید در سال ۱۹۷۲ گزارش نموده است این ماده نقصهای کروموزومی در موش‌های آزمایشگاهی ایجاد نمی‌کند و برای جنینهای جوندگان توکسیک نمی‌باشد و خاصیت تعدیل‌کننده سیستم ایمنی دارد [۳۸].

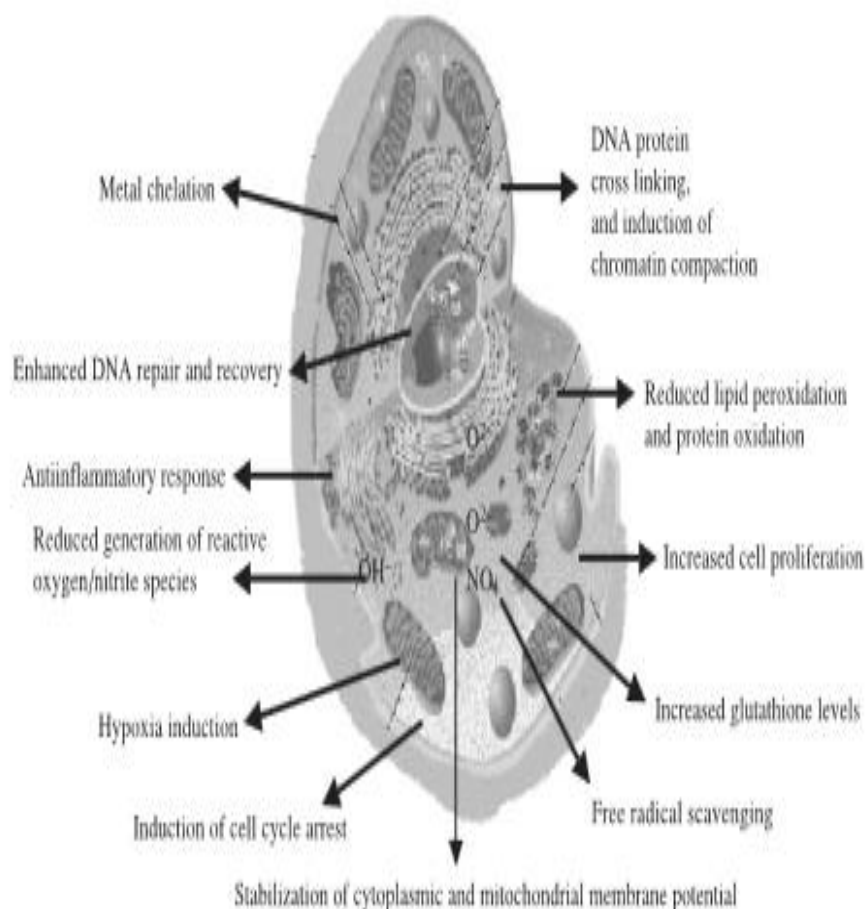
اثرات سوء این ماده بستگی به حساسیت افراد دارد در بعضی افراد دریافت روزانه ۱۰۰ میلی گرم و در بعضی دیگر ۴۰۰ میلی گرم باعث بروز اثرات سوء شده است. با توجه به اینکه دریافت روزانه ۱۰۰ میلی گرم از این ماده اثرات سوء کمتری ایجاد میکند و دارای فاکتور ایمنی ۱۰ می‌باشد پس میزان کمتر از ۱۰ میلی گرم در روز به عنوان دز بی خطر گزارش شده است [۳۹]. ساختمان مولکولی اسید گلیسرئیک در شکل ۲-۲ نشان داده شده است.



شکل ۲-۲. ساختمان مولکولی اسید گلیسرینیک [۱۴]

اثر رادیو پروتکتوری شماری از گیاهان داروئی مورد بررسی قرار گرفته است. عصاره گیاهان دارای خاصیت آنتی اکسیدانت، تعدیل کننده سیستم ایمنی، ضد التهاب و ضد میکروب می باشد.

تعدادی از مکانیسمهای رادیوپروتکتوری در شکل ۲-۳ نشان داده شده است. آنتی اکسیدانتهای موجود در عصاره گیاهان از طریق اسکاونجر رادیکالهای آزاد سلول را در مقابل ROS/RNS محافظت میکند. افزایش سطح ROS/RNS در طول پرتوتابی با استفاده از آنتی اکسیدانتهای موجود در گیاهان بطور موثری کاهش می یابد. اسید گلیسرزیک با خاصیت رادیوپروتکتوری خود باعث آزاد سازی آنتی اکسیدانتهای در محیط بیولوژیکی می شود. این ماده همچنین از طریق تعدیل فعالیت ایمنی نقش رادیوپروتکتوری از خود نشان میدهد. بیماران با سرطان ریه که بعد از اولین درمان رادیوتراپی دچار پنومونی شده بودند به علت عود مجدد تومور نه ماه بعد از رادیوتراپی، جهت کاهش پنومونی ناشی از رادیاسیون روزانه ۱۵۰ میلی گرم اسید گلیسرزیک دریافت کردند که نتایج بطور غیر منتظره ای خوشحال کننده بود [۴۰].



شکل ۲-۳. مکانیسمهای رادیوپروتکتوری [۴۰]

Study of radioprotective effect of glyzyrrhizic acid on early and late lung tissue changes in irradiated mice via assessment of TNF- α gene and protein expression

Abstract:

Background and aim: The use of radiation therapy to treat cancer inevitably involves exposure of normal tissues. This study presents the study of radioprotective effect of glyzyrrhizic acid (GLA) on early and late lung tissue changes in irradiated mice via assessment of TNF- α gene and protein expression.

Methods and materials: 150 male Wistar rats were divided into four groups. The rats in group1 received whole thoracic radiation (16 Gy) without GLA (XRT-group). The rats in group2 received both GLA (4mg/kg intraperitoneal. i.p., 1 h before irradiation) and thoracic radiation (GLA/XRT- group). The rats in group3 received GLA (4mg/kg i.p., 1 h before irradiation) but no irradiation (GLA-group). The rats in group4 received neither GLA nor irradiation (NT-group). The rats were sacrificed at 1, 6h, 1, 3days, 1, 2, 4, 8 and 16 weeks post treatment (p.t.). Real time RT-PCR was established to evaluate the relative mRNA expression of TNF- α in the lung tissue of the rats (compared with NT-group lung tissue). The protein expression of TNF- α in the lung tissue was quantified by ELISA. Data histopathological alterations compared in four groups.

Results: The early lung injury histopathological examination showed significant differences in the XRT group compared with other groups. The late lung damage showed no significant differences in the groups. Following thoracic irradiation with a single dose of 16 Gy the gene expression of TNF- α in the lung tissue of the XRT-group rats was clearly higher at all assessment time points compared to other groups rats (statistically significant only at 1 h p.t.). The protein expression of TNF- α in the lung tissue of the XRT-group rats was markedly higher at all assessment time points compared to other groups rats (statistically significant at 6 h, 16 week p.t.).

Conclusions: GLA down regulates the TNF- α mRNA and protein production in the lung tissue in responses to radiation by scavenging free radicals that led to reduction of radiation induced lung injury.

Keywords: Glyzyrrhizic acid, Radiation, TNF- α gene and protein expression, Lung injury.



Tehran University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

Department of Medical Physics and Engineering

A Thesis Presented for Ph.D Degree of Medical Physics

Title:

Study of radioprotective effect of glyzyrrhizic acid on early and late lung tissue changes in irradiated mice
via assessment of TNF- α gene and protein expression

By:

Soheila Refahi

Supervisor:

Dr. Abbas Takavar

Advisors:

Dr. Bagher Minaei

Dr. Samideh Khoei

Dr. Gholamhassan Haddadi

Year:

2014

NO: 36